

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 06-293645

(43)Date of publication of application : 21.10.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/70  
// C07H 19/10  
C07H 19/20  
C12N 9/99

(21)Application number : 05-083391

(71)Applicant : SANEYOSHI MINERO  
SHUDO KOICHI

(22)Date of filing : 09.04.1993

(72)Inventor : SANEYOSHI MINERO  
SHUDO KOICHI**(54) REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR**

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a reverse transcriptase inhibitor having a strong inhibitory effect on a reverse transcriptase produced by HIV and useful for improvement and prevention of AIDS and for suppression or retardation of the crisis after infection with AIDS virus.

**CONSTITUTION:** There is provided a reverse transcriptase inhibitor containing 2'-deoxy-L-ribonucleotide-5'-triphosphate, preferably 2'-deoxy-L-thymidine-5'-triphosphate as the active component and having a strong inhibitory effect on a reverse transcriptase produced by retrovirus. This compound can be produced by converting an L-nucleotide (an optical antipode of a natural type nucleotide) into its monophosphate, e.g. in the presence of phosphorus oxychloride and subsequently synthesizing its corresponding 5'-triphosphate compound therefrom, e.g. according to phosphorimidazolide method. This compound is also useful as a reagent for studies in the fields of biochemistry, genetic engineering etc.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

07.04.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3693357

[Date of registration]

01.07.2005

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-293645

(43)公開日 平成6年(1994)10月21日

(51)IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	ADY	8314-4C		
// C 0 7 H 19/10				
19/20				
C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平5-83391	(71)出願人	593070147 実吉 峯郎 東京都八王子市散田町 1-7-7-305
(22)出願日	平成5年(1993)4月9日	(71)出願人	000182432 首藤 紘一 東京都目黒区東山 2丁目25番 6-102号 公務員宿舍
		(72)発明者	実吉 峯郎 東京都八王子市散田町 1-7-7-305
		(72)発明者	首藤 紘一 東京都目黒区東山 2丁目25番 6-102号 公務員宿舍
		(74)代理人	弁理士 今村 正純

(54)【発明の名称】 逆転写酵素阻害剤

(57)【要約】

【構成】 2'-デオキシ-リボヌクレオシド  
5'-トリリン酸、例えば2'-デオキシ-リチミジ  
ン 5'-トリリン酸を有効成分として含む逆転写酵素  
阻害剤。

【効果】 レトロウイルス、例えばHIVの産生する逆  
転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や予防、な  
らびにエイズ・ウイルス感染後の発病抑制・遅延に有用  
である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用  
いられる試薬としても有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド  
5'-トリリル酸を有効成分として含む逆転写酵素阻  
害剤。

【請求項2】 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-  
トリリル酸を有効成分として含む請求項1記載の逆転写  
酵素阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、逆転写酵素阻害剤に関  
する。さらに詳しくは、本発明は、エイズウイルス（H  
IV：ヒト免疫不全ウイルス）等のレトロウイルスが産  
生する逆転写酵素を阻害し、後天性免疫不全症候群（AIDS、エイズ）の治療や感染後の発病抑制に有用な逆転写  
酵素阻害剤に関する。

【従来の技術】従来、天然型ヌクレオシドの光学対掌体  
（エナンチオマー）である非天然型エナンチオヌクレオ  
シドが種々合成されてきた。これらのうち、L型ヌクレ  
オシドに属する3'-チア-2'-デオキシ-L-シチ  
ジン（3TC, Antimicrob. Agents Chemother., 36, 1688-1  
694, 1992）および3'-チア-2'-デオキシ-5-  
フルオロ-L-シチジン（FTC, Antimicrob. Agents Che  
mother., 36, 2423-2431, 1992）には強い抗HIV活性  
が報告されている。また、L-チミジンが、単純ヘルペ  
スウイルスI型にコードされるチミジンキナーゼによっ  
てリン酸化され、感染細胞中におけるウイルスの複製を  
阻害することが報告されている（J. Med. Chem., 35, 42  
14-4220, 1992）。

【0002】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するた  
めの手段】本発明者は、2'-デオキシ-L-リボヌク  
レオシド 5'-トリリル酸を製造してその生物活性を  
検討したところ、この化合物がレトロウイルスの産生す  
る逆転写酵素を強く阻害することを見出し、本発明を完  
成するに至った。本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にH  
IVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズ  
の治療や予防、ならびにエイズ・ウイルス感染後の発病  
抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等  
の研究のために用いられる試薬としても有用である。本  
発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分として含まれる2'-  
デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリル酸  
としては、例えば、2'-デオキシ-L-チミジン  
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-L-ウリジン  
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-L-アデニン  
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-L-グアノシン  
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-L-シチジン  
5'-トリリル酸等の天然型2'-デオキシリボヌクレ  
オシド 5'-トリリル酸の光学対掌体、および2'-  
デオキシ-L-5-フルオロウリジン 5'-トリリル  
酸等の非天然型2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-

トリリル酸の光学対掌体を挙げることができる。

【0003】本発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分とし  
て含まれる2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド  
5'-トリリル酸は、L-チミジン等のL-ヌクレオシ  
ド（天然型ヌクレオシドの光学対掌体）を、例えばオキ  
シ塩化リル等により5'-モノリル酸化体とした後、例  
えばホスホロイミダゾリデート法によって対応する5'-  
トリリル酸化体とすることにより製造することができる。  
本発明の逆転写酵素阻害剤を、例えばHIVウイル  
ス等のレトロウイルスの関与する疾患などの治療や予  
防、またはレトロウイルス感染後の発病抑制あるいは遅  
延のための医薬として用いることができる。この場合に  
は、上記の2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド  
5'-トリリル酸を有効成分として含む医薬組成物とし  
て患者に投与すればよい。医薬組成物としては、例え  
ば、カプセル剤、錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、シロッ  
ブ剤等の経口投与用組成物、あるいは注射剤、坐剤、点  
眼剤、眼軟膏、点耳剤、または外用剤等の非経口投与  
用組成物を挙げることができる。これらの医薬用組成物  
は常法により製造できるが、必要により薬理学的、製剤  
学的に許容しうる添加物を加えて製造してもよい。

【0004】経口剤及び坐剤の製造には、乳糖、D-マン  
ニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等の  
賦形剤；カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチ  
ルセルロースカルシウム等の崩壊剤；ヒドロキシプロピ  
ルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、  
ポリビニルピロリドン等の結合剤；ステアリン酸マグネ  
シウム、タルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチル  
セルロース、白糖、酸化チタン等のコーティング剤；又  
はポリエチレングリコール、ハードファット等の基剤を  
製剤用成分として使用すればよい。注射剤あるいは点  
眼、点耳剤の製造には、注射用蒸留水、生理食塩水、ブ  
ロビレングリコール等の水性あるいは用時溶解型剤型を  
構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤；無機又は有機の酸  
あるいは塩基のpH調節剤；食塩、ブドウ糖、グリセリン  
等の等張化剤；又は安定化剤等の製剤成分を使用すれば  
よい。眼軟膏剤、外用剤の製造には、白色ワセリン、  
マクロゴール、グリセリン、綿布等の軟膏剤、クリーム  
剤、貼付剤に汎用される適切な製剤成分を使用すればよ  
い。本発明の逆転写酵素阻害剤を医薬組成物として用い  
る場合には、例えば、成人の患者に対して、有効成分で  
ある2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリ  
リル酸の一日あたり投与量が0.1～1,000 mg/kg 程度  
となるように投与すればよいが、治療や予防の目的や患  
者の年齢や症状により適宜増減してもよい。

【0005】

【実施例】以下、本発明の好ましい態様である2'-デ  
オキシ-L-チミジン 5'-トリリル酸についてさら  
に具体的に説明するが、本発明はこの化合物およびこれ  
らの実施例に限定されることはない。

例1: 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸の製造

L-チミジン20mg (0.083ミリモル) をりん酸トリエチル1mlに溶解し、-10℃に冷却した後、オキシ塩化りん50μlを添加した。4℃にて16時間反応させた後、反応液を1M炭酸水素ナトリウム水溶液2mlに攪拌しながら注いだ。中和後、水を添加して全量を50mlに希釈した後、クロロホルム10mlで3回洗浄した。水層をDEAE-セルロース(3cm I.D. × 7cm, Whatman DE-52)に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカーボネートの直線濃度勾配(0-0.3M, 500ml×2)で溶出した。5'-モノりん酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-モノりん酸(L-dTMP)を得た。505 OD<sub>267</sub> (0.1N HCl) 収率 63%

【0006】2'-デオキシ-L-チミジン 5'-モノりん酸 475 OD<sub>267</sub>をジメチルホルムアミドに溶解し、カルボニルジイミダゾール40.5mgを添加後、室温にて3.5時間攪拌した。メタノール15.4μlを添加して30分攪拌した後、ピロリン酸トリブチルアミン塩ジメチルホルムアミド溶液(0.6ミリモル/ml)1mlを添加し室温で24時間攪拌した。反応液を減圧乾固した後、残渣を水50mlに溶解して、活性炭1グラムを添加した。穏やかに10分間攪拌した後に濾過し、残渣に水50mlを添加して溶解した。この溶液をDEAE-セルロース(3cm I.D. × 7cm, Whatman DE-52)に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカーボネートの直線濃度勾配(0-0.5M, 500ml×2)で溶出した。5'-トリリン酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'-デオキシ-L-チミジン5'-トリリン酸(L-dTTP)を得た。370 OD<sub>267</sub> (0.1N HCl) 収率 7\*

\* 8%

UV吸収スペクトル: λ max 267 nm (H<sub>2</sub>O)

りん原子含量 : 計算値 ε(p) 267 nm (H<sub>2</sub>O)= 3,200

実測値 ε(p)=2,900

HPLC分析 : 保持時間 6.8分 純度97%  
カラム YMCODS A-302逆相樹脂、水-アセトニトリルおよび1Mトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液(pH 7.0)(78:2:20, v/v/v)、流速1ml/分、50℃。

【0007】例2: 試験例

上記の2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸(L-dTTP)を用いて真核生物およびウイルスのDNAポリメラーゼに対する作用を検討した。ポリメラーゼとしては、コウシ胸腺DNAポリメラーゼα(Pol α)、ラットDNAポリメラーゼβ(Pol β: Date, T., et al., Biochemistry, 27, 2983-2990, 1988)、ウシ肝臓DNAポリメラーゼγ(Pol γ: Izuta, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 776-783, 1991)、およびHIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素(HIV-1 RT)を用いた。DNAポリメラーゼβとレトロウイルス逆転写酵素は、遺伝子組換えにより大腸菌で生産、精製された酵素である。酵素活性測定は、以下の表1に示す条件を用い、各ポリメラーゼを37℃で20分間インキュベートした後、反応液を冷却してDE 81イオン交換紙に吸着させ、5%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>で6回、つづいて水で2回洗浄した後、イオン交換紙を乾燥して放射活性を測定することにより行った。

【0008】

【表1】

	HIV-1 RT	Pol α	Pol β	Pol γ
50 mM Tris-HCl	pH8.3	pH7.5	pH8.8	
40 mM KPi				pH7.5
MnCl <sub>2</sub>	0.5 mM		0.5 mM	0.5 mM
MgCl <sub>2</sub>		4 mM		
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
BSA	100 μg/ml	400 μg/ml	400 μg/ml	400 μg/ml
KCl	50 mM		100 mM	50 mM
ポリ[rA]	20 μg/ml		40 μg/ml	40 μg/ml
オリゴ[dT]	10 μg/ml		40 μg/ml	10 μg/ml
活性化DNA		100 μg/ml		
[ <sup>3</sup> H]dTTP	50 μM	50 μM	50 μM	50 μM
dATP		100 μM		
dCTP		100 μM		
dGTP		100 μM		
酵素量(ユニット)	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6

【0009】上記の各DNAポリメラーゼに対する2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸(L-d

TTP)の作用を50  $\mu$ M dTTP存在下で検討した。対照として、抗HIV剤として周知の3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)の5'-トリリン酸化体(AZT-TP: Ono, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 498-507, 1986) および $\alpha$ -dTTP(Yamaguchi, T., et al., Chem. Pharm. Bull., 32, 1441-1450, 1984)を用いた。Pol $\alpha$ の鋳型プライマーとして活性化DNAを用いた場合、L-dTTPによる阻害効果はほとんど認められず、Pol $\beta$ に対しても、ポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いた場合には、わずかな阻害が認められるにすぎなかった。一方、Pol $\gamma$ に対しては、L-dTTPによる阻害効果が認められたが、AZT-TPと比較すると、その阻害活性はやや低かった。また、 $\alpha$ -dTTPはPol $\gamma$ に対して弱い阻害作用を示した。レトロウイルス逆転写酵素の活性測定に頻用されるポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いると、L-dTTPはHIV-1 RTに対して強い阻害作用を示した。結果を図1ないし図4に示す。図4に示されたL-dTTPのHIV-1 RTに対する阻害効果について、ラインウィーバー-バーク・プロットで酵素阻害様式を検討したところ、L-dTTPは基質であるdTTP\*

\*Pと拮抗阻害することが示された。HIV-1 RTに対するL-dTTPの $K_i/K_m$ 値は0.07であり、L-dTTPはHIV-1 RTに対して、基質のdTTPよりも約14倍高い親和性を示した。

【0010】

【発明の効果】本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にHIVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。

【図面の簡単な説明】

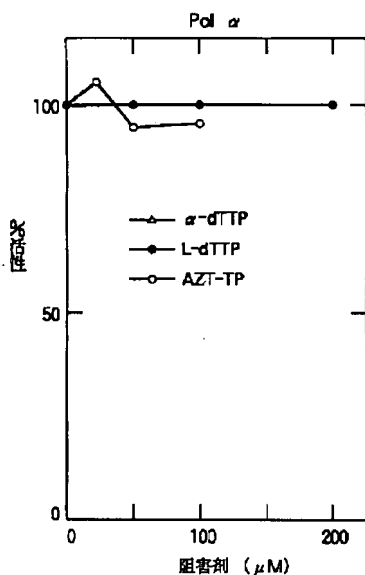
【図1】 コウシ胸腺DNAポリメラーゼ $\alpha$ (Pol $\alpha$ )に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図2】 ラットDNAポリメラーゼ $\beta$ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

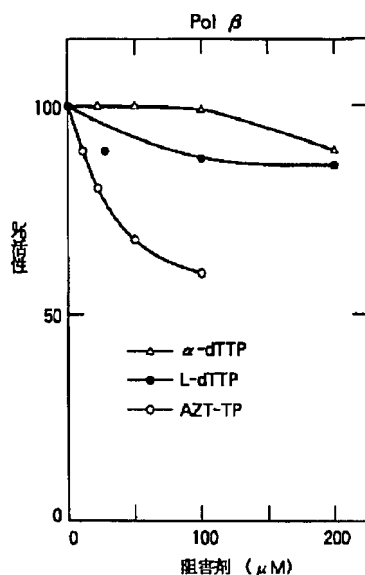
【図3】 ウシ肝臓DNAポリメラーゼ $\gamma$ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図4】 HIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素(HIV-1 RT)に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

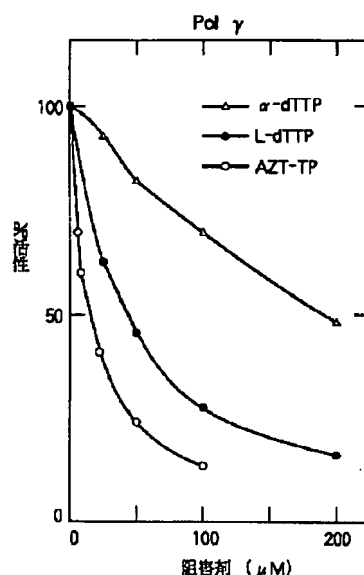
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

